

Messung des Monomerenabstandes im F-Aktin mit Hilfe des Energie-
Transfers in einem Donor-Akzeptor-System

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
vorgelegt beim Fachbereich Biochemie und Pharmazie der Johann
Wolfgang Goethe - Universität in Frankfurt am Main

von

Hermann Graf
aus Kelkheim/Ts

Frankfurt/Main

Juni 1975



Mit Genehmigung des Fachbereiches Biochemie und Pharmazie zum Druck
gekürzt.

Dekan: Prof.Dr. G.Schneider

- 1.Gutachter Prof.Dr.Dr.H.Fasold
- 2.Gutachter Prof.Dr. C. Woenckhaus

*Tag d. mündl. Prüfung und Tag
der Promotion: 26. September 1976*

1976



Einleitung

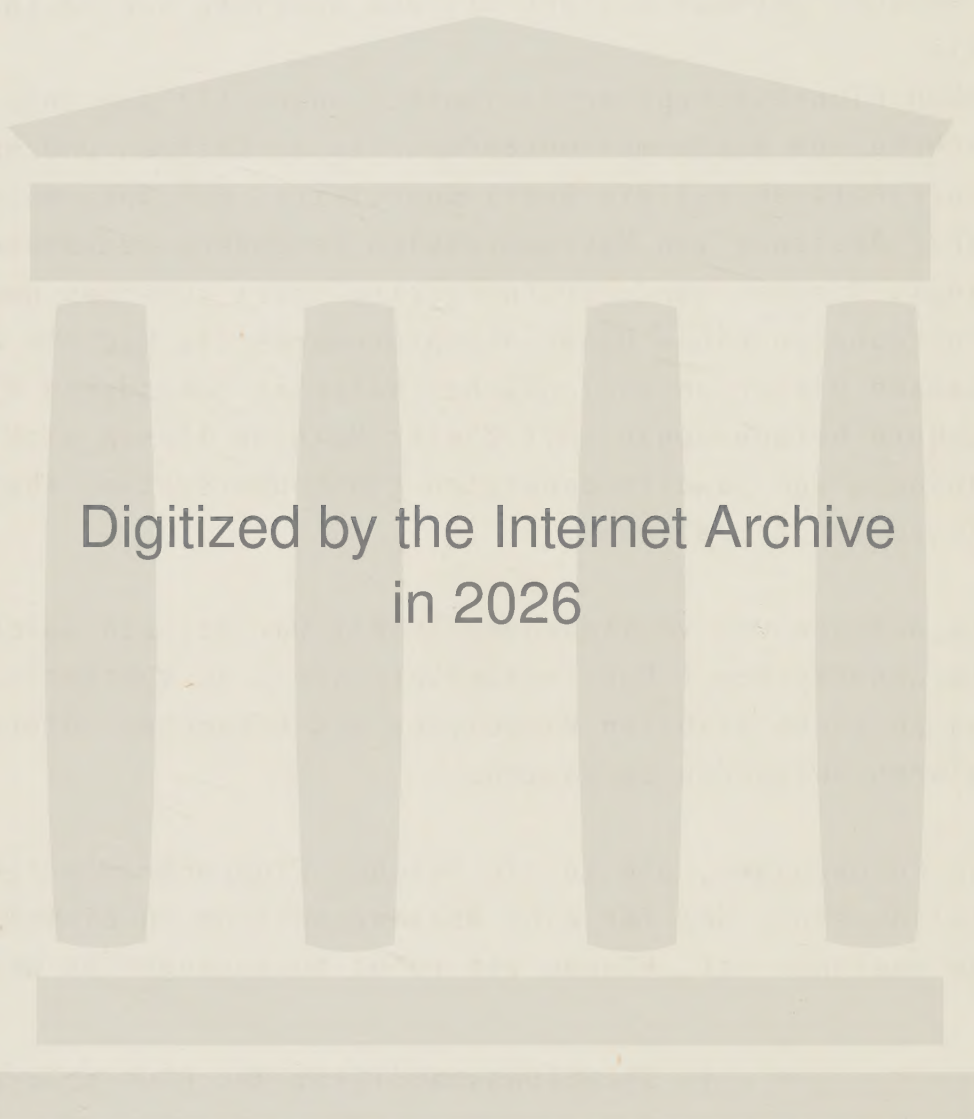
Die quantitative Erfassung fluoreszenzspektroskopischer Daten zu Untersuchungen an biologischem Material ist zu einem festen Bestandteil biochemischer Forschung geworden. Die Eignung der Fluoreszenzspektroskopie als biochemische Methode beginnt mit den Arbeiten von Th.Förster (1).

Neben Fluoreszenzpolarisationsmessungen (2) zur Untersuchung von Konformationsänderungen an Enzymen und Hormonrezeptoren hat die Bestimmung intra- und intermolekularer Abstände von Makromolekülen besondere Bedeutung erlangt. Hierbei wird der Energietransport zwischen den Fluorophoren eines Donor-Akzeptorpaars als Maß für den Abstand dieser an biologisches Material gebundenen Fluorophore herangezogen. Mit dieser Methode lassen sich, abhängig vom jeweils benutzten Fluorophorsystem, Abstände bis zu 100 Å bestimmen.

Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, ein solches Fluorophorsystem (Donor-Akzeptor-Paar) zu synthetisieren und an einem stabilen Biopolymer mit bekannten intermolekularen Abständen zu testen.

Die Forderungen, die an ein solches Fluorochromsystem zu stellen sind, das für eine Abstandsmessung an Biopolymeren geeignet ist, können wie folgt zusammengefaßt werden:

1. Strahlungstabilität der Fluorophore,
2. Hohe Quantenausbeute des Donors auch in wäßrigem Milieu,
3. Hoher molarer Absorptionskoeffizient des Akzeptors im Bereich seiner Excitation,



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41550826_0041

4. weitgehende Überlappung von Donoremis-
sion- und Akzeptorexcitationspektrum,
5. Keine Überlappung von Donorexcitation-
mit Akzeptorexcitationspektrum,
6. Möglichkeit der spezifischen Anheftung
an funktionelle Seiten von Proteinen,
und dieses
7. ohne Beeinträchtigung der Nativität der
Proteine.
8. Freie Drehbarkeit der Fluorophore am
Protein.

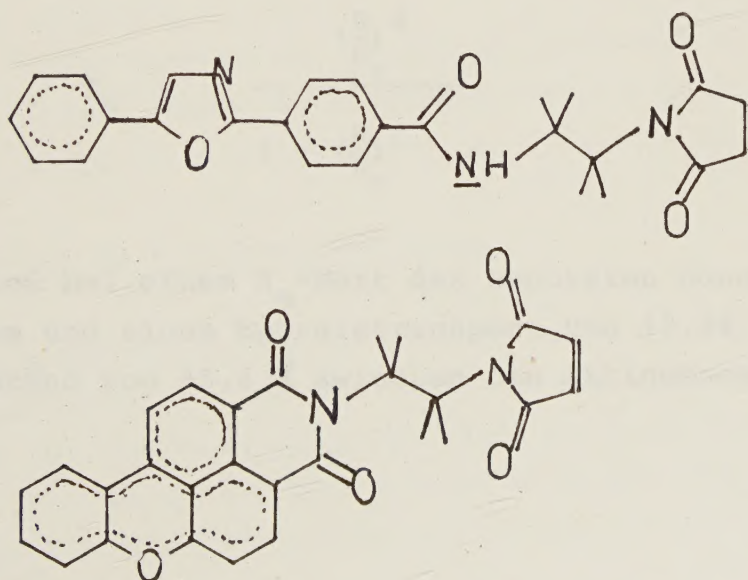
Der Versuch, ein Fluorophorsystem zu synthetisieren, das allen diesen Forderungen genügt, war die eigentliche Aufgabe der vorliegenden Arbeit.

Ergebnisse

Die beiden Fluoreszenzfarbstoffe, die die obigen Forderungen größtenteils erfüllen konnten, sind ein Diphenyloxazol-Derivat als Donormolekel und ein Xanthen-Derivat, das als Akzeptormolekel verwendet wurde. Beide Substanzen sind außerordentlich strahlungsstabil, sie finden als Szintillationszusatz bzw. als Lichtechte Farbstoffe industrielle Verwendung. Das Xanthen-Derivat besitzt einen Dicarbonsäureanhydridring, der eine Derivatisierung begünstigt. Das reaktive Maleimid-Derivat dieser Verbindung, das für die hier gezeigten Messungen verwendet wurde, ist schon früher beschrieben worden. (3)

Als Grundkörper für den Donorfluorophor wurde ein Diphenyloxazol-Derivat gewählt, das auch in wäßriger Lösung und nach seiner notwendigen Modifizierung zum Proteinreagenz noch eine hohe Quantenausbeute der Fluoreszenz besitzt. Seine maximale Excitation wird bei 326 nm erreicht, also bei einer Wellenlänge, bei der die proteineigene Fluoreszenz nicht mehr sehr stark angeregt wird. Damit ist eine Zerstörung des modifizierten Proteins durch Licht mit einer für die Anregung des Donorfluorophors geeigneten Wellenlänge nicht wahrscheinlich. Das Emissionsspektrum des Donorfluorophors zeigt eine sehr gute Überlappung mit dem Excitationsspektrum des Xanthenderivates, des Akzeptors. Das Excitationsspektrum des Oxazolderivates zeigt, wie gefordert, keine Überlappung mit dem Excitationsspektrum des Akzeptors, des Xanthenderivates also.

Neben anderen Derivaten (4) , wurden die Maleimid-Derivate der beiden genannten Fluorophore synthetisiert. Zwischen dem Sulfhydryl-Gruppen spezifischen N-Maleimid und dem Fluorophor wurde eine Äthylengruppe eingeführt, damit eine freie Drehbarkeit der Fluorophore auch am Protein gewährleistet sein sollte. Der Abstand des Fluorophors von der Bindungsstelle am Protein beträgt ca. 7 - 10 Å.



Fluoreszenzmessungen

Das für die Fluoreszenzmessungen verwendete Gerät ist schematisch in der ungekürzten Fassung der vorliegenden Arbeit aufgezeichnet. Das Gerät liefert quantenkorrigierte Spektren und ist außerdem in der Lage, Integrale zu bilden und diese mathematisch zu verknüpfen. Diese apparativen Möglichkeiten ließen eine recht simple Meßfolge zur Bestimmung des Energietransfers zwischen den am Protein sitzenden Fluorophoren zu.

Zuerst wurde die Lösung von G-Aktin vermessen, die zu gleichen Teilen mit Donor- oder Akzeptorfluorophor verknüpft waren. Durch die ungeordnete Struktur des G-Aktin mit großen intermolekularen Abständen ist kein Energietransport zwischen Donor und Akzeptor möglich. Nach Zugabe einer KCl/MgCl_2 -Lösung bildet sich das fibrilläre F-Aktin mit definierten Abständen zwischen den einzelnen Monomeren. Es sollte ein Energietransfer stattfinden.

Der gemessene Energietransport betrug 12,2 % der Donoremissionsenergie.

Nach

$$T_E = \frac{\left(\frac{R}{R_O}\right)^6}{1 + \left(\frac{R}{R_O}\right)^6}$$

ergibt sich bei einem R_O -Wert des benutzten Donor-Akzeptor-System und einem Energietransport von 12,2% ein mittlerer Abstand von 55,6 Å zwischen den Aktinmonomeren im F-Aktin.

Fluoreszenzmarkierung von F-Aktin

Zur Fluoreszenzmarkierung des Aktin wurde dieses Protein in seine fibrilläre Struktur überführt. (F-Aktin) In diesem Zustand ist nur eine sehr reaktive SH-Gruppe des Proteins einer Modifizierung zugänglich.(5)

Das als klarsichtiges Pellet erhaltene F-Aktin wurde in wenig Puffer aufgenommen und sucessiv mit einem 3-fachen molaren Überschuß an reaktivem Fluorophor versetzt. Das Reagenz wurde hierzu in Dioxan gelöst und zwar in hoher Konzentration, damit die finale Dioxan-Konzentration der Proteinlösung nicht mehr als 5% betrug.

Die Reaktion ist bei R.T. nach ca. einer halben Stunde abgeschlossen. Die Proteinlösung wurde danach 24 Stunden dialysiert und dabei F-Aktin in G-Aktin überführt. Diese G-Aktinlösung wurde schließlich an G-25 Sephadex chromatographiert. Vor allen Fluoreszenzmessungen wurde das G-Aktin durch einen Polymerisationsschritt gereinigt.

Nativität des markierten Proteins

Die Nativität des Aktins wird durch die Bestimmung seines Polymerisationsverhaltens ermittelt. Benötigte Proteinkonzentration: 0,3 mg/ml (minimal).

Die gereinigten Lösungen der verschieden markierten Aktinproben wurden auch nach 24stündigem Aufbewahren bei 4°C durch Erhöhung der Salzkonzentration polymerisiert, d.h. sie sind noch nativ.(4)

Selektivität der Fluoreszenzmarkierung

²durch die Verwendung eines Maleimid-Derivates zur Anheftung der Fluorophore wird im Falle des F-Aktin nur eine äußere SH-Gruppe markiert (5). Die Markierungsraten lagen bei nicht reduzierten Protein zwischen 0,9 und 1,2. Nach Reduktion mit NaBH₄ werden höhere Markierungsraten erzielt, das Protein ist jedoch nicht mehr nativ (4).

Diskussion

Aktin eignet sich aufgrund seiner hohen Stabilität und gut bekannten Struktur als Modell für die Anwendung eines Fluorophor-Systems, in dem ein Energietransport möglich ist.

Der Monomerenabstand im F-Aktin von ca. 54 Å stimmt recht gut mit dem aus den Fluoreszenzdaten ermittelten Abstand der Fluorophore überein.

Bei der Anwendung des hier synthetisierten Donor-Akzeptor-System an anderen Biopolymeren müssen jedoch die getroffene Vereinfachungen berücksichtigt werden, die wegen der Komplexität der beim Energietransfer zu beachtenden Parameter notwendig waren. Diese Vereinfachungen sind ausführlich besprochen worden (4).

Die einfache Meßanordnung, wie sie hier gefunden werden konnte, wird sich mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht auf alle Biopolymeren übertragen lassen, sodaß weitergehende Messungen wie Polarisationsmessungen, Lebensdauermessungen und Depolarisationsstudien notwendig werden können.

Literatur

- (1) Th.Förster Annalen der Physik 6, 55 (1948)
- (2) Mercado BBA 298, 639 (1973)
- (3) M.Salzer Diplomarbeit Frankfurt 1972
- (4) H.Graf Ungekürzte Fassung der Dissertation
Frankfurt/Main 1975
- (5) H.Fasold Biochemistry 8 , 2933 (1969)

Akademische Lehrer

Prof.Dr.Dr. H.Fasold, Prof.Bock, Prof.Dänzer, Prof.Freise, Prof.Fritz,
Prof. Hartmann, Prof. Hensen, Prof.Kelm, Prof.König, Prof.Martiensen,
Prof.Mutschler, Prof. ODaniel, Prof. Queisser, Prof. Ried, Prof.Royen,
Prof.Teuber, Prof.Trömel, Prof.Wilk.

Lebenslauf

Am 14.6.1948 wurde ich in Kelkheim/Ts als Sohn der Eheleute Wilhelm und Margarete Graf geboren.

- 1954 - 1958 Grundschule in Kelkheim-Hornau
- 1958 - 1966 Besuch des Leibnitz-Gymnasiums in Frankfurt-Höchst
- 1966 - 1967 Privatgymnasium in Kelkheim, Zeugnis der Reife
- 1967 - 1972 Chemiestudium an der J.W.-Goethe-Universität in
Frankfurt/Main
- 1972 - 1973 Diplomarbeit am Institut für Biochemie dieser
Universität unter Anleitung von H.Prof.H.Fasold
- 1973 - heute Dissertation am gleichen Institut

Ich versichere eidesstattlich, daß ich außer den aufgeführten Hilfsmitteln keine weiteren zur Anfertigung dieser Arbeit benutzt habe.

